

黄色花シクラメンにおける花色と花色素発現の関係

高村武二郎・瀬上弥生・田中静子

Relationship between coloration and pigmentation in petals of yellow-flowered cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.)

Takejiro Takamura, Yayoi Segami and Shizuko Tanaka

Summary

Yellow-flowered cyclamens contained flavonol glycosides as well as chalcononaringenin 2'-glucoside in the petals. The yellow petals with large amount of chalcononaringenin 2'-glucoside and small amount of flavonol glycosides were deeper than those with large amount of flavonol glycosides as well as chalcononaringenin 2'-glucoside. Little anthocyanidin was detected in hydrolysates from the former petals. On the other hand, relatively large amount of anthocyanidin was detected in hydrolysates from the latter petals, suggesting that leucoanthocyanidins were synthesized in the latter petals.

Key Words : cyclamen, yellow-flowered, chalcone, flavonol, pigmentation, coloration

緒 言

花きにとって花色はその価値を左右する最も大きな要因であり、花色の改良は、花きの育種における最重要目標のひとつである。シクラメンにおいても、花色の多様化を目的とした育種が行われてきたが、長い間その花色は、赤、白、紫および中間色に限られており、ようやく黄色花が作出されたのは1980年代であった⁽¹⁾。

花において黄色を呈する原因となっている色素には、カロテノイド系色素⁽²⁾、フラボノイド系色素の1種であるカルコン⁽³⁾およびオーロン⁽⁴⁾等があるが、これまでに報告された黄色花シクラメンの主要花色素はいずれにおいてもカルコンの配糖体であるカルコノナリンゲニン2'-グルコシド (Ch2'G) である^(1, 5, 6)。カルコンは化学的に不安定であるが、配糖体化により安定した物質となっており⁽⁷⁾、黄色花シクラメンにおいてもカルコンの2'位にグルコースが修飾されることにより、安定した色素として花弁細胞内に存在しているものと考えられている。

ところで、黄色花シクラメンの花色はいずれの品種・系統においても淡黄色であり、濃黄色花シクラメン品種はまだ育成されていないことから⁽⁸⁾、花弁のさらなる濃色化が望まれている。しかしながら、二倍体黄色花シク

ラメンを倍加した場合にCh2'Gが増加して濃色化することが報告されているものの⁽⁶⁾、同じ倍数体における黄色花シクラメンの花色の濃淡と花色素量や組成との関係についての明確な報告はなく、黄色花のさらなる濃色化にあたって、これらの関係を明確にすることが必要であると考えられる。そこで本研究では、二倍体黄色花シクラメンにおける花色と花色素発現様式との関係について調査を行った。

材料および方法

1. 植物材料

花弁slip部分にほとんどアントシアニンが含まれていないことが確認されている二倍体のシクラメン黄色花個体を用いた。これらの個体は、二倍体黄色花系統または二倍体黄色花品種と二倍体有色花品種とのF₂世代で得られた黄色花個体であり、花弁に底紅を有するものと認められないものとの両方が含まれていた。

2. 花色の調査

いずれの黄色花個体においても開花当日の花弁を採取し、測色色差計 (NR-3000, 日本電色工業製) を用いてslip部分の花色の調査を行った。

3. 花色素の分析

採取後40℃で22時間乾燥させ、常温乾燥条件下で保存しておいた花卉を適宜実験に用いた。なお、底紅を有する花卉においては、採取後に底紅部分を切り取り、この部分は分析に用いなかった。乾燥花卉5枚の乾燥重量を測定後、5%ギ酸メタノールで抽出した花色素類を、メンブランフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過した後に5 mlに定容し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて抽出液中のカルコンおよびフラボノール配糖体を調査した。HPLCシステムにはSCL-10Aシステムコントローラー（島津製作所製）、SPD-10AV検出器（島津製作所製）、LC-10ATポンプ（島津製作所製）、コスモシル5C18AR-IIカラム（4.6×50 mm+4.6×250 mm、ナカライテスク製）、ならびに40℃に設定したCTO-10Aカラムオープンを用いた。検出波長は360 nmとし、溶媒Aを1.5%リン酸、溶媒Bを1.5%リン酸-20%酢酸-25%アセトニトリルとした混合溶液（75:25, v/v）を用いて、溶媒Bの濃度を40分後に85%に変化させる直線的濃度勾配による溶出法を適用した。混合溶液の流速は0.8 ml・min⁻¹に維持した。カルコン配糖体の標品としては、黄色花カーネーションの花卉より抽出したCh2'Gを用いた。

また、定容後の抽出液1 mlに等量の2 M塩酸を加えて、約90℃で120分間加熱して完全加水分解した。得られた酸加水分解物を減圧乾固させ、これを1 mlの5%ギ酸-メタノールで再抽出し、メンブランフィルターにてろ過した後にHPLCの分析に用いた。

フラボノールアグリコンの分析におけるHPLCシステムおよび検出波長はカルコンおよびフラボノール配糖体の分析と同様とし、溶媒Aを0.1 M酢酸、溶媒Bをアセトニトリルとした混合溶液（70:30, v/v）を用いた。混合溶液の流速は1.0 ml・min⁻¹に維持した。フラボノールアグリコンの同定にはミリセチン、ケルセチンおよびケンフェロールの標品との比較を行った。さらに、ロイコアントシアニジンの推定のためのアントシアニン分析におけるHPLCシステムはアントシアニンの分析と同様にし、溶媒Aを4%リン酸、溶媒Bをアセトニトリルとした混合溶液（83:17, v/v）を用いた。検出波長は530 nm、混合溶液の流速は1.0 ml・min⁻¹とした。

結果および考察

いずれの黄色花個体においても主要花色素としてCh2'Gが検出され、保持時間値の異なる多数のフラボノール配糖体も検出された（第1図）。これらのHPLCによるクロマトグラムは、検出された花色素の多くがCh2'Gであるタイプ1とCh2'Gに加えて多量のフラボ

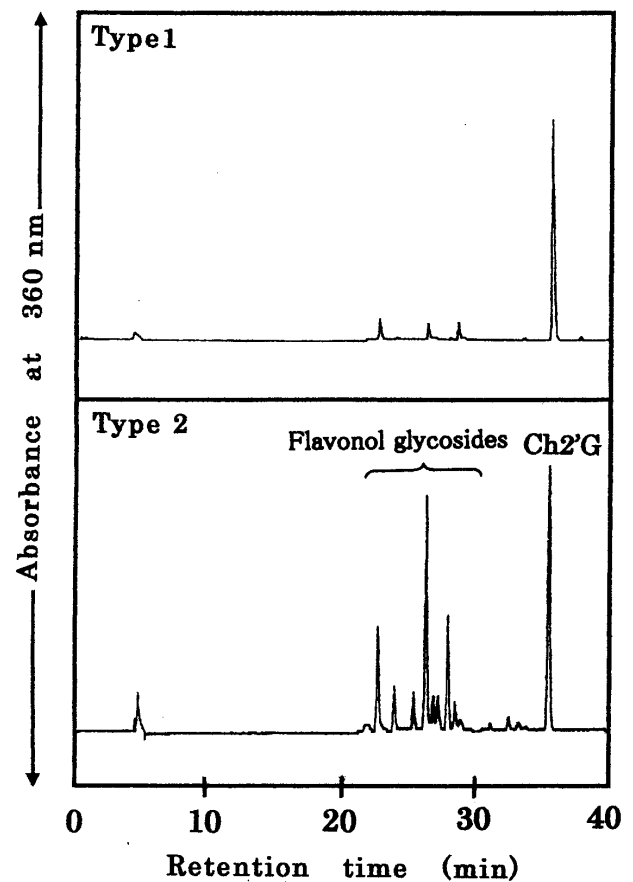


Fig. 1. Typical HPLC profiles of chalcone and flavonol glycosides from the petals of yellow-flowered cyclamens. Ch2'G: Chalconaringenin 2'-glucoside.

Table 1. Coloration in the petal slips of yellow-flowered cyclamens.

Type of HPLC profiles ^z	No. of plants observed	Value in color difference ^y		
		L*	a*	b*
Type 1	11	91.87 ± 1.07	-7.88 ± 0.43	22.69 ± 1.01
Type 2	10	90.26 ± 1.21	-5.61 ± 0.52	18.08 ± 1.10

^z See Fig. 1.

^y Mean value ± SE.

ノール配糖体が検出されたタイプ2に分けられた。

黄色花個体の花色はタイプ1とタイプ2で差異が認められた。すなわち、タイプ1は値が高くなるにつれ緑から赤へと色合いが変化するa*の平均値が-7.88、値が高くなるにつれて青から黄色へと色合いが変化するb*の平均値が22.69の黄色花卉を有したのに対し、タイプ2ではa*の平均値が-5.61、b*の平均値が18.08と、花卉が淡色化する傾向が認められた（第1表）。

これら2つのタイプの花卉からの抽出液の酸加水分解

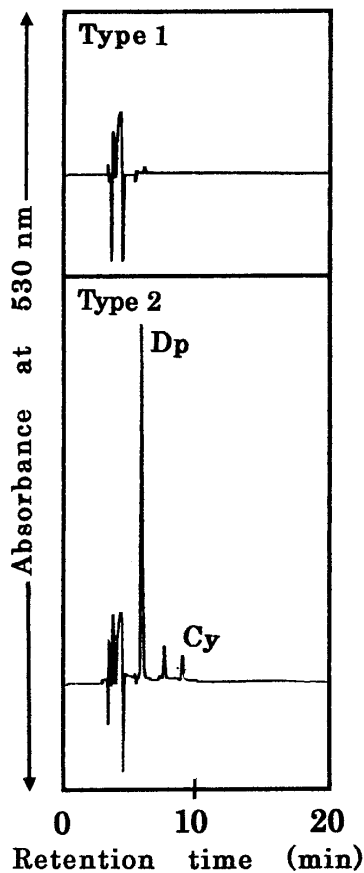


Fig. 2. Typical HPLC profiles of anthocyanidins in hydrolysates from the petals of yellow-flowered cyclamens. Cy: Cyanidin, Dp: Delphinidin.

液中からは、フラボノールのケンフェロールおよびケルセチンが全ての個体で検出されたが、その含有比は各個体でそれぞれ異なった（データ未掲載）。また、いずれの個体においても、加水分解液からデルフィニジンおよびシアニジンの2つのアントシアニンが検出されたが（第2図）、検出されたアントシアニン量はタイプ2に比べてタイプ1で著しく低い値であった。ロイコアントシアニンは塩酸液中で加熱することにより、アントシアニンに変性すること⁽⁹⁾、および今回用いた黄色花個体にはほとんどアントシアニンが含まれていなかったことから、これらの黄色花個体の花弁中でロイコアントシアニンが生成されていたものと考えられる。

一般にアントシアニンを形成しない白、アイボリーホワイトおよび極淡いクリーム色といった花色は、ナリンゲニンからジヒドロフラボノールへと変化させるフラバノン3-ヒドロキシラーゼ（F3H）、ジヒドロフラボノールからロイコアントシアニンへと変化させるジヒドロフラボノール4-レダクターゼ（DFR）またはロイコアントシアニンからアントシアニンへと変化させるア

ントシアニンシンターゼ（ANS）の欠乏によって引き起こされると考えられることが報告されており⁽¹⁰⁾、アントシアニンの配糖体化酵素（3GT）が欠乏した場合もアントシアニン生成が抑制されることが報告されている^(11, 12)。シクラメンの白色花では、ロイコアントシアニンまでは生成されているものと考えられており⁽¹³⁾、本実験で用いたアントシアニンを形成しない黄色花個体のいずれにおいても、ロイコアントシアニンが生成されていたと考えられたことから、これらの黄色花個体でも白色花と同様、いずれの個体でも花弁でF3HやDFRは発現していたものの、ANSと3GTのいずれかまたは両方が生成されていないか、もしくはその作用が阻害されていたものと推測される。

本実験では、花弁中のカルコン量に比べてフラボノール量の割合が小さいタイプ1の個体では、加水分解物中のアントシアニン量も少なく、フラボノール量の割合が大きいタイプ2の個体では加水分解物中のアントシアニン量も多くなった。このことは、タイプ1と比較してタイプ2では、カルコンからフラバノンへの代謝を触媒するカルコンイソメラーゼ（CHI）の生成を支配するCHI遺伝子の発現の抑制が不完全である、あるいは化学的に不安定なカルコンを配糖体化して安定にする酵素2'-グルコシルトランスフェラーゼ（2'GT）の発現が弱いまたは遅いことによって、Forkmann and Dangelmayr⁽¹⁴⁾が報告したようにCHI遺伝子の発現が抑制されてもカルコンがより多くのフラバノンへ非酵素的に変化するために、フラボノイド生合成経路では、フラバノンより下流のロイコアントシアニンやフラボノールがより多く生成されている可能性を示している。

以上のように、黄色花シクラメン個体には花色の濃淡に関する差異が存在し、Ch2'Gに対してフラボノール配糖体量の少ない個体で、黄色が強く発現する傾向が認められた。主要花色素である花弁の濃淡に影響するものとしては、まず花弁の色素生成能力による生成された花色素の全体量が考えられるが、本研究の結果、黄色花シクラメンでは、それ以外にCHIまたは2'GTの発現に個体間差異があり、その差異がカルコン以外のロイコアントシアニンおよびフラボノールの生成、ならびにカルコン集積の差異を引き起こし、花色の濃淡の一因となっているものと示唆される。

摘 要

黄色花シクラメン個体の花弁には主要花色素であるCh2'Gだけでなくフラボノール配糖体も含まれており、Ch2'Gに対してフラボノール配糖体量の少ない個体で、

黄色が強く発現する傾向が認められた。また、これらの個体の花色素の加水分解物からはアントシアニジンはほとんど検出されなかった。一方、フラボノール配糖体量

の多い個体の花色素の加水分解物からは比較的多量のアントシアニジンが検出され、ロイコアントシアニジンが生成されていたことが推測された。

引用文献

- (1) Miyajima, I., Maehara, T., Kage, T. and Fujieda, K. : Identification of main agent causing yellow color of yellow-flowered cyclamen mutant. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 60, 409-414 (1991).
- (2) Nielsen, K. M. and Bloor, S. J. : Analysis and developmental profile of carotenoid pigments in the petals of three yellow petunia cultivars. *Sci. Hort.*, 71, 257-266 (1997).
- (3) Harbone, J. B. : Comparative biochemistry of flavonoids-I. Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry*, 5, 111-115 (1966).
- (4) Sato, T., Nakayama, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Nishino, T., Tanaka, Y. and Kusumi, T. : Enzymatic formation of aurones in extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Sci.*, 160, 229-236 (2001).
- (5) Takamura, T., Tomihara, T. and Miyajima, I. : Inheritance of yellow-flowered characteristic and yellow pigments in diploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) cultivars. *Sci. Hort.*, 64, 55-63 (1995).
- (6) Takamura, T. and Miyajima, I. : Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Sci. Hort.*, 65, 305-312 (1996).
- (7) Harbone, J. B. : Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London and New York (1967).
- (8) Takamura, T. : Cyclamen, Flower Breeding & Genetics : Issues, challenges, and opportunities for the 21st century (N. O. Anderson ed.), PP. 459-478, Springer-Verlag, Dordrecht (2006).
- (9) Creasy, L. L. and Swain, T. : Structure of condensed tannins. *Nature*, 208, 151-153 (1965).
- (10) Onozaki, T., Mato, M., Shibata, M. and Ikeda, H.: Difference in flower color and pigments composition among white carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar. *Sci. Hort.*, 82, 103-111 (1999).
- (11) Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C. K., Yakushiji, H. and Goto, N.: Comparison of UDP-glucose : flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.*, 160, 543-550 (2001).
- (12) Chen, W., Hsu, C, Chen, H., Chan, H., Chen, H. and Ger, M.: Downregulation of putative UDP-glucose : flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.*, 30, 1007-1017 (2011).
- (13) 高村武二郎, 杉村隆之 : シアニック系シクラメン品種の花色および花色素, 香川大学農学部学術報告, 60, 39-45 (2008).
- (14) Forkmann, G. and Dangelmayr, B. : Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. *Biochem. Genet.*, 18, 519-527 (1980).